

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO NAS CÓRNEAS DOS CÃES TRATADOS COM 2-1 FOSFATO DISSÓDICO DE BETAMETASONA E FOSFATO DISSÓDICO/ACETATO DE DEXAMETASONA, QUE RECEBERAM TRANSPLANTES COM CÓRNEAS DE SUÍNOS¹

Nilo Sérgio Troncoso Chaves², Paulo Sérgio de Moraes Barros³, Apóstolo Ferreira Martins², Eugênio Gonçalves de Araújo², Larissa Franco de Araújo⁴, Duvaldo Eurides⁵ e Luiz Antonio Franco da Silva²

ABSTRACT

Histopathological Study in Corneas of Dogs, Treated With 2-1 Dissodic Phosphate of Betamethasone and Dissodic Fosphate/Acetate of Dexamethasone, that Had Received Implantation of Swine Corneas

Ten dogs, with no definitive breed, average weight of 10 kg, were in this research. After being examined and considered healthy they received numbers, from 11 to 20 in their collars. Each dog received implantation, in the left eye, of swine cornea, obtained at Casa de Banha Caçula, a slaughterhouse, and maintained in wet chamber for six hour at most. Before surgery, each animal received 4 mg of dissodic phosphate/acetate dexamethasone IM and, once a week, one drop of dissodic phosphate betamethasone and gentamicin sulphate, four times a day, until the 28th day, when the animals were sacrificed through painless process (Thiopental sodic + succinilcolin chloride), and the eye that had received the implantation of swine cornea was enucleated. Formaldehyde 10% was injected in the vitreous camera and after that the eye was placed in a container and the cornea was removed with sclerous ring, treated and colored with hematoxilin-eosin. The implantation and the cornea nearby areas were analysed as well as the alterations.

KEY WORDS: Histopatology, corticosteroids, xenotranplant, cornea, canine and swine.

RESUMO

Foram utilizados 10 cães, sem raça definida, com peso médio de 10kg, examinados e considerados sadios. Cada cão, a seu tempo, teve implantada no olho

1 - Entregue para publicação em Outubro de 1996. Trabalho parcial de tese.

2 - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Cx. Postal 131 - CEP 74001-970 - Goiânia-GO.

3 - Departamento de Cirurgia/FMVZ/USP.

4 - Bolsista da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

5 - Universidade Federal de Uberlândia.

esquerdo córnea de suíno, conservada em câmara úmida pelo período máximo de seis horas. Cada animal antes da cirurgia recebeu 4mg de fosfato dissódico/acetato de dexametasona, por via intramuscular, e uma gota de fosfato dissódico de betametasona/sulfato de gentamicina colírio. Conservou-se a medicação ocular 4 vezes/dia e a intramuscular semanalmente, até o sacrifício do cão. Cada qual foi sacrificado por processo indolor (thiopental sódico + cloreto de succinilcolina) e teve o olho que recebeu implante com córnea de suíno enucleado. Foi injetado formol 10% na câmara do vítreo e a córnea foi removida com aba escleral, tratada e corada com hematoxilina-eosina. Foram analisadas as seguintes áreas: enxerto, áreas adjacentes receptoras e observadas as várias alterações.

PALAVRAS-CHAVE: Histopatologia, corticosteróides, xenotransplantes, córnea, canino e suíno

INTRODUÇÃO

O sucesso dos transplantes depende, além do controle de outros fundamentos biológicos, principalmente das reações de rejeição que o organismo possui contra o enxerto. Estes fenômenos são mais intensos nos xenoenxertos. Na tentativa de analisar as reações de rejeição, desencadeadas no xenotransplante de córnea no cão em nível de histologia óptica, produziu-se este trabalho.

Babel & Burquim (1952 a,b) demonstraram a intensa proliferação fibroblástica, infiltração eosinofólica, neovascularização, necrose e fibrose nos xenoenxertos interlamelares desenvolvidos por eles.

Payrau *et al.* (1961 a,b) descreveram em xenotransplantes perfurantes as seguintes alterações: irregularidades epiteliais, desorganização de lamelas, vascularização profunda, deslocamento ou ausência da membrana de Descemet, edema e necrose.

Faure (1964) observou infiltrações inflamatórias, proliferação fibroblástica, digestão do enxerto, edema, *tyndall* na câmara anterior e neovascularização do enxerto carreando linfócitos, plasmócitos e eosinófilos.

Polack (1966) encontrou alterações morfológicas no tecido fibroso e colágeno extracorneano, no estroma, na substância fundamental e no mesotélio. Encontrou, ainda, neovascularização, proliferação de fibroblastos, edema, lise celular, úlceras de epitélio e do estroma e formação da membrana retrocorneana.

Graf *et al.* (1972) efetuaram estudos ultra-estruturais da reabsorção do xenoenxerto interlamelar de vitela em coelho e observaram as seguintes alterações: degeneração e reabsorção do enxerto, infiltrados inflamatórios (neutrófilos, macrófagos, granulócitos, células epitelióides e células gigantes). Mostraram que a evolução tardia do enxerto seguia três possibilidades: 1- rejeição verdadeira do enxerto pela ulceração das camadas superficiais; 2- reabsorção incompleta com persistência da maior parte de seu tecido conjuntivo; 3- reabsorção, algumas vezes completa, com permanência de

tecido conjuntivo após vários meses. Menezo e Rycroft, em 1975, analisando heteroenxertos, concluíram que as córneas doadoras serviam como trama arquitetônica na qual se introduziam novos elementos provenientes do receptor.

Basu & Ormsby, King (1957), Galvão (1976) e Jacomini (1982) mostraram o aparecimento de um tecido inflamatório, substituindo o endotélio doador devido à falência do mesmo, denominado membrana retrocorneana.

MATERIAL E MÉTODOS

Dez cães receberam xenoenxertos penetrantes com córneas de suínos e foram tratados com fosfato dissódico de betametasona e sulfato de gentamicina colírio, 4 vezes ao dia e fosfato dissódico/acetato de dexametasona/semanalmente. Estes cães foram sacrificados e o olho que havia sido enxertado foi enucleado e preparado da seguinte forma: injetou-se formol 10% na câmara do vítreo, sendo posteriormente imerso em um recipiente com 200 ml da mesma substância. Oportunamente a córnea foi separada do olho, tratada, inserida nos blocos de parafina, cortada com micrótomo com lâminas descartáveis e coradas com hematoxilina-eosina para as leituras e fotografias policromáticas em microscópio óptico triocular. Para as leituras das lâminas foram consideradas três áreas: 1- enxerto; 2 e 3 - áreas adjacentes receptoras. Em todas as áreas foram analisados os seguintes requisitos: 1- epitélio (preservado, não preservado, úlceras); 2- membrana de Descemet (preservada e não preservada); 3- endotélio (visível, não visível); 4- proliferação de fibroblastos (+, ++, +++); 5- proliferação vascular (+, ++, +++); 6- degeneração de fibras colágenas (+, ++, +++); 7- reação inflamatória (+, ++, +++); 8- predominância celular (neutrófilo, eosinófilo, linfócito, monócito ou plasmócito); 9- pigmentação (presente ou ausente); e 10- hemorragia (presente ou ausente).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinco cães (50%) foram sacrificados e enucleados no 28° dia, três cães (30%) no intervalo do 14° ao 21° dia e dois cães (20%) se autotraumatizaram e suas córneas não foram analisadas. Todos os animais apresentaram sinais de hiperadrenocorticismo secundário (alopecia, diarreia com sangue, perda de peso, fraqueza e atrofia muscular e necrose de pele e de gengiva), sendo estes responsáveis pelo sacrifício abreviado das três unidades experimentais.

As alterações histopatológicas foram as seguintes: (Figuras 1, 2, 3 e 4)

ÁREA 1:

- Epitélio preservado - 62,5%
- Epitélio não preservado (com úlcera) - 37,5%
- Membrana de Descemet semipreservada - 25%

- Membrana de Descemet preservada - 75%
- Endotélio semivisível - 12,5%
- Endotélio não visível - 87,5%
- Proliferação de fibroblastos - 50% (+++)
- Proliferação vascular - 37,5% (+++)
- Reação inflamatória - 50% (+++)
- Infiltrado inflamatório - Neutrófilos (25%), Linfócitos (25%)
- Degeneração de fibras colágenas - 75% (+++)
- Sem pigmentação - 100%
- Hemorragia - 50%
- Sem hemorragia - 50%

ÁREAS 2 e 3 :

As áreas 2 e 3 tiveram o epitélio, o estroma e a membrana de Descemet preservados. As alterações se limitaram à zona de transição do enxerto.

- Proliferação de fibroblastos - 62,5% (+++)
- Reação inflamatória - 50% (+++)
- Infiltrado inflamatório - neutrófilos (25%), linfócitos(25%)
- Degeneração de fibras colágenas - 22,22% (+++)
- Com pigmentação - 77,77%
- Sem pigmentação - 22,22%

O enxerto ideal seria aquele que tivesse suas estruturas celulares preservadas, a cicatriz organizada no leito receptor, a reação inflamatória não exacerbada com infiltrados naturais, sem degeneração de fibras colágenas e sem invasão de vasos sanguíneos, pigmentos e hemorragias.

Porém, na maioria dos implantes, observavam-se a desorganização da membrana de Descemet e a destruição do endotélio. Mesmo nos enxertos com preservação do epitélio, havia um discreto processo inflamatório, sem degeneração de fibras colágenas e pigmentação; a córnea doadora ficou opaca e edemaciada. Todas estas alterações se traduzem em processos de rejeição e coincidem com aquelas observadas por Babel & Burquin (1952 a,b), Payrau *et al.* (1961 a,b), Faure (1964), Polack (1966), Graft *et al.* (1972).

Observou-se que as células necrosadas do epitélio do doador foram sendo substituídas por aquelas homovitalis do receptor, servindo o primeiro como um esqueleto para o segundo, fato este que coincide com as observações de Menezes (1972) e Rycroft (1975).

A formação da membrana retrocorneana, observada em todos os cortes histológicos deste experimento, também foi descrita por Basu & Ormsby, King (1957).

Galvão (1976), Jacomini (1982). Acredita-se que os principais fatores para a opacificação dos xenotransplantes, feitos por esta equipe, deveram-se à falência do endotélio e à desorganização da membrana de Descemet, que são responsáveis pela barreira natural do humor aquoso que manteria equilibrada a hidratação das outras camadas da córnea.

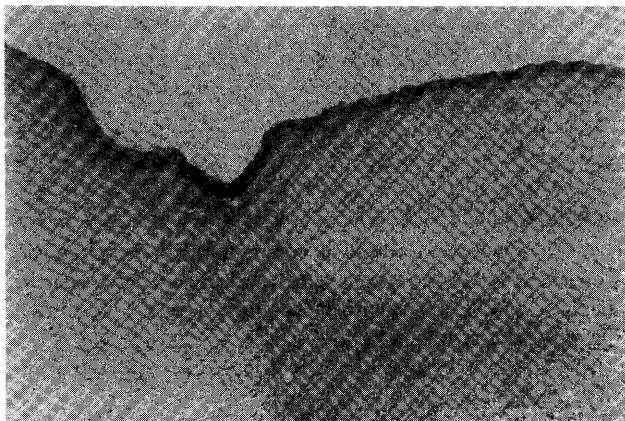


Figura 1 - Zona de transição do enxerto com desorganização da membrana de Descemet, ausência de endotélio, formação de membrana retrocorneana, infiltrado inflamatório observados em fotomicrografia (125x) de córnea doadora/receptora, no cão n.º 17, no 28.º dia pós-xenotransplante

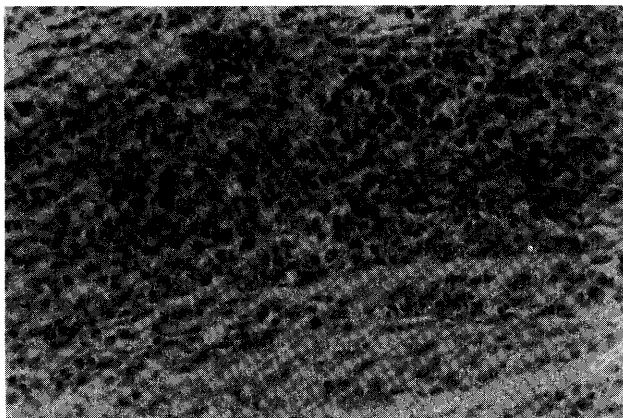


Figura 2 - Infiltrado linfoplasmático observado em fotomicrografia (200x) de córnea doadora, no cão n.º 20, no 28.º dia pós-xenotransplante

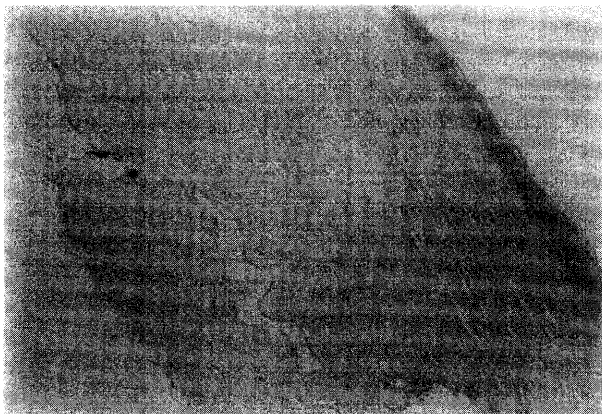


Figura 3 - Solução de continuidade na membrana de Descemet e formação da membrana retrocorneana observada em fotomicrografia (32x) de córnea doadora, no cão n.º 16, no 28.º dia pós-xenotransplante

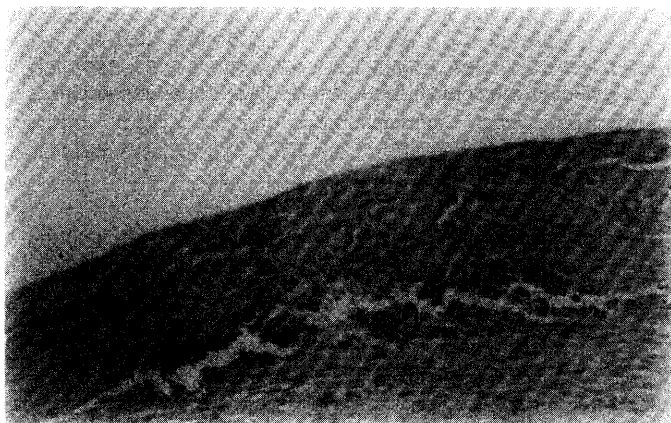


Figura 4 - Hemorragia subepitelial e no estroma corneano observada em fotomicrografia (320x) de córnea doadora, no cão n.º 11, no 28.º dia pós-xenotransplante

CONCLUSÕES

Mesmo com a atenuação da proliferação de fibroblastos, da reação inflamatória com infiltrados (linfócitos e neutrófilos), da proliferação vascular, da degeneração de

fibras colágenas, da invasão de pigmentos e da hemorragia nos cortes histológicos das córneas dos cães, tanto nas áreas 1, 2 ou 3, ficou demonstrado que os corticosteróides, embora tenham desenvolvido hiperadrenocorticismo secundário – num sinal claro de supressão imunocelular –, não foram capazes de abolir as reações de rejeição.

A falência do endotélio e a desorganização da membrana de Descemet se constituíram em fatores fundamentais para a opacificação dos xenoenxertos aqui estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babel, J. & J.B. Bourquin. 1952b.** Experimental research with corneal heterografts. *Br. J. Ophthalmol.*, 36 : 529-536, 1952a. Nouvelles recherches esperimentales sur les hetégreffes de cornée. *Bull. Men. Fr. Ophtalmol.*, 65 : 360-70.
- Basu, P.K. & H. L. Ormsby. 1957.** Corneal heterografts in rabbits. *Am. J. Ophthalmol.*, 44: 477-9.
- Faure, J. P. 1964.** Les réactions immunologiques dans les greffes de la cornée. *Arch. Opht.*, 24 : 501-603.
- Galvão, P. G. 1976.** Transplante de córnea (Estudo clínico, imunológico e histopatológico, em 211 casos de aloenxertos-perfurantes, no homem). Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. 510p.
- Graft, B., Y. Kosak, Y. Pouliquen, M.A. Calvet & Faure J.P. 1972.** Ultrastructural study of the resorption of corneal xenografts in rabbits. *Exp. Eye Res.* 14 : 283-8.
- Jacomini, C. Z. 1982.** Conservação de córneas pelo meio de cultura de tecidos RPMI-1640 modificado (Estudo clínico e histopatológico de transplante alógeno em coelho com córneas conservadas a curto e médio prazo). Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. 134p.
- King, J. H. 1957.** Experimental studies with corneas preserved by dhydration. *Am. J. Ophthalmol.*, 43:353-80.
- Menezo, J.L.R. 1972.** Queratoplastias laminares com córneas silico-dehidratadas. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, 32: 365-92.
- Payrau, P., Y. Pouliquen & J. P. Faure. 1961b.** Hétérogreffes de la cornée; étude expérimentale et premiers résultats cliniques. *Ann. d'Ocul.*, 194 : 1-30, 1961a. Hétérogreffes de la cornée; étude expérimentale et premier résultats cliniques. *Ann. d'Ocul.*, 194 : 123-32.
- Polack, F. M.** The pathological anatomy of corneal grafts rejection. *Concilium Germania Ophthalm.*, 20 pars II, VII, 855-90.
- Rycroft, B. W. 1975.** Corneal grafts, London, Butter Worths.